

Abstract of DE4011991

Method for DNA base sequencing comprises, (1) cloning a no. of DNA samples in different vectors (1-4), (2) synthesising the complementary strands of the samples (5-8) in admixture with primers (9-12) each primer being able to hybridise with only one particular vector and each labelled with different fluorophores having different emission wavelengths, (3) prepn. of 4 DNA-fragment gp. each with different end gps. from the resulting mixts. (i.e. 5-9, 6-10, 7-11, 8-12) and (4) electrophoretic migration of the fragment gps. and determination of fluorescence emission from the fragments in each gp.

USE/ADVANTAGE - This method does not require complex sample pretreatments and, unlike the conventional multiplex DNA sequencing procedure, is not limited to samples which can be labelled with radiosotopes. Many samples can be processed simultaneously and no correction is required for differences in electrophoretic migration rates caused by different labelling dyes.

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 4011991 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 40 11 991.2
㉔ Anmeldetag: 12. 4. 90
㉕ Offenlegungstag: 18. 10. 90

㉙ Int. Cl. 5:
G01 N 33/68
G 01 N 27/447
C 12 N 15/63
C 12 P 19/34

DE 4011991 A1

㉓ Unionspriorität: ㉔ ㉕ ㉖
12.04.89 JP 1-90844

㉗ Anmelder:
Hitachi, Ltd., Tokio/Tokyo, JP

㉘ Vertreter:
Pagenberg, J., Dr.jur.; Frohwitter, B., Dipl.-Ing.,
Rechtsanwälte; Geißler, B., Dipl.-Phys.Dr.jur., Pat.-
u. Rechtsanw.; Kowal-Wolk, T., Dr.jur., Rechtsanw.;
Bardehle, H., Dipl.-Ing.; Dost, W., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Altenburg, U., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte,
8000 München

㉚ Erfinder:
Kambara, Hideki, Hachioji, Tokio/Tokyo, JP

㉙ Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung

Ein Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung kann wirkungsvoll DNA-basensequenzen von vielen Proben bestimmen, jeweils dadurch, daß die Proben simultan im Gemisch verarbeitet werden können, einschließend: einen Schritt in dem eine Vielzahl von DNA-Proben mit jeweils unterschiedlichen Vektoren kloniert wird; einen Schritt, in dem die erhaltenen Proben im Gemisch mit Primern komplementärketten-synthetisiert werden, entsprechend den jeweiligen Vektoren, wobei die Primer nur mit einem besonderen der Vektoren einzeln hybridisiert werden können, und wobei die Primer mit jeweils unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind; einen Schritt in dem jede der erhaltenen behandelten Mischungen in vier Teile geteilt wird und wobei die DNA-Fragmentgruppen so gebildet werden, daß Endgruppen davon Adenin, Cytosin, Guanin bzw. Thymin werden können und einen Schritt, in dem die vier DNA-Fragmentgruppen, klassifiziert durch Endgruppen, auf Elektrophoresebahnen individuell unterschiedlich elektrophoretisch bewegt werden, und Fluoreszenzlicht, emittiert von den DNA-Fragmenten jeder DNA-Fragmentgruppe, nachgewiesen wird.

DE 4011991 A1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur wirkungsvollen Basensequenzbestimmung.

Eine herkömmliche Technik, die für die Bestimmung von DNA-Basensequenzen verwendet wird, ist Autoradiographie. Andererseits ist kürzlich ein Echtzeitnachweissystem unter Verwendung von Fluoreszenzmarkern entwickelt worden. Bei dieser Technik werden DNA-Fragmente mit vier unterschiedlichen Fluorophoren entsprechend den vier jeweiligen Sorten oder Arten von Anschlußgattungen, bzw. Endgruppen, bzw. endständigen Basen markiert und auf eine Wanderungsbahn bzw. Migrationsbahn zur Wanderung über eine bestimmte Entfernung injiziert und dann wird ein Laserstrahl darauf angelegt, um zu beobachtendes Fluoreszenzlicht zu emittieren. Die Endgruppen der DNA-Fragmente können durch die Wellenlängen des Fluoreszenzlichts erkannt werden und anhand der Nachweiszeit kann die DNA-Basensequenz bestimmt werden.

Bei einer anderen Technik werden DNA-Fragmente, die vier Sorten von Endgruppen haben und mit einem einzigen Fluorophor markiert werden, auf vier unterschiedliche Wanderungsbahnen injiziert, um das emittierte Fluoreszenzlicht zu messen und die DNA-Basensequenzen zu bestimmen.

Die obenerwähnten herkömmlichen Techniken haben den Mangel, daß für jede zu bestimmende Probe komplizierte Vorbereitungen gemacht werden müssen.

Um diese komplizierten Vorbereitungen zu vermeiden, wird ein Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung angegeben, das einschließt

- (1) einen Schritt 1, in dem verschiedene DNA-Proben in jeweils verschiedene Vektoren eingefügt bzw. inkorporiert bzw. eingebaut werden;
- (2) einen Schritt 2, in dem in einem einzigen Reagenzröhrchen gleichzeitig komplementäre Ketten zu den DNA-Proben synthetisiert werden, um DNA-Fragmente zu bilden;
- (3) einen Schritt 3, in dem die DNA-Fragmente elektrophoretisch getrennt und auf Filter immobilisiert werden;
- (4) einen Schritt 4, in dem eine mit einem Radioisotop markierte DNA-Sonde an einer der DNA-Proben angebracht wird, mit der sie als einziger hybridisieren kann, um das DNA-Fragment für die Bestimmung der DNA-Basensequenz in der DNA-Probe nachzuweisen;
- (5) einen Schritt 5, in dem die mit den Radioisotop markierte DNA-Sonde ausgewaschen wird und eine andere mit einem Radioisotop markierte Sonde an einer anderen DNA-Probe angebracht wird, mit der sie hybridisieren kann, um das DNA-Fragment zur Bestimmung der DNA-Basensequenz der DNA-Probe nachzuweisen und,
- (6) einen Schritt 6, in dem das Verfahren nach Schritt 5 für die anderen restlichen DNA-Proben wiederholt wird, bis ihre Basensequenz bestimmt werden kann.

Das obenerwähnte Verfahren gestattet die gleichzeitige Reaktion bzw. Umsetzung und Elektrophorese zur Bestimmung der DNA-Basensequenzen von vielen Proben. Diese Technik wurde von G. M. Church et al. "Multiplex DNA-Sequencing", Science, Bd. 240 (1988), Seiten 185 bis 188, beschrieben.

Das obenerwähnte Verfahren kann nicht für Proben

verwendet werden, die anders als die Radioisotopen markiert sind, weil das DNA-Bandmuster auf dem Filter fixiert werden muß. Der Grund ist, daß die Verwendung von Fluoreszenzsonden die Lichtstreuung durch Filter zur Folge hat, was eine zu niedrige Empfindlichkeit ergibt.

Es ist das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren anzugeben, welches die Schwierigkeiten der oben erwähnten herkömmlichen Technik vermeidet und eine DNA-Basensequenzbestimmung durch Fluoreszenzlichtnachweis mit einer Vielzahl von gleichzeitig zu verarbeitenden Proben möglich macht.

Als Ergebnis der Untersuchungen der Erfinder ist nun gefunden worden, daß das oben erwähnte Ziel der Erfindung mit einem Verfahren erreicht werden kann, das beinhaltet: einen Schritt 1, in dem verschiedene DNA-Proben in jeweils verschiedene Vektoren geklont werden, einen Schritt 2, in dem verschiedene Primer hergestellt werden, die einzig mit den entsprechenden Vektoren hybridisiert werden können und welche mit jeweils unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind; einen Schritt 3, in dem zu den in Schritt 1 erhaltenen Proben, im Gemisch mit den oben erwähnten verschiedenen Primern, komplementäre Ketten synthetisiert werden; einen Schritt 4, in dem aus den bekannten Gemischen, die in Schritt 3 erhalten wurden, vier DNA-Fragmentgruppen mit jeweils vier unterschiedlichen Endgruppen hergestellt werden; und einen Schritt 5, in dem die durch die Endgruppen klassifizierten vier DNA-Fragmentgruppen auf individuell unterschiedlichen Elektrophoresebahnen elektrophoretisch wandern gelassen werden und, daß von den DNA-Fragmenten jeder DNA-Fragmentgruppe emittierte Fluoreszenzlicht nachgewiesen wird.

Auf der Grundlage der neuen Erkenntnis haben die Erfinder die vorliegende Erfindung weiter studiert und vervollständigt. Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung ist wie folgt:

Es werden Einzelstrang-DNA-Proben hergestellt, bei denen eine Vielzahl von Basensequenzen, jeweils eingefügt in verschiedene Vektoren, bestimmt werden sollen. Primer, deren Anzahl mit der Anzahl der Arten von Vektoren korrespondiert, deren Basensequenzen voneinander unterschiedlich sind und welche nur mit einem bestimmten Vektor hybridisiert werden können, werden mit jeweiligen Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen markiert. Die mit den jeweiligen Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen markierten Primer werden mit der Vielzahl der entsprechenden unterschiedlichen Vektoren für die jeweiligen Einzelstrang-DNA-Proben derart hybridisiert, daß alle DNA-Proben mit allen Primern gemischt und umgesetzt werden; das Gemisch der umgesetzten Proben wird in vier Teile aufgeteilt; in den in vier Teilen geteilten Gemischen der Proben werden einzeln komplementäre Ketten synthetisiert, so daß die Endgruppen davon Adenin, Cytosin, Guanin bzw. Thymin sind, wodurch einzeln eine DNA-Fragmentgruppe hergestellt wird, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Adenin ist, eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Cytosin ist, eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Guanin ist, und eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Thymin ist; die jeweiligen DNA-Fragmentgruppen werden elektrophoretisch wandern gelassen; individuelles Fluoreszenzlicht, das von den DNA-Fragmenten jeder Gruppe emittiert wird, wird nachgewiesen, und die Proben wer-

den getrennt und entsprechend den unterschiedlichen Emissionswellenlängen der Vielzahl der DNA-Proben nachgewiesen.

Als Vektoren können verwendet werden, z. B., ein bekannter M13-Vektor, YAC-Vektor, pUC-Vektor etc. Die Einzelstrang-DNA-Proben können in einer Art und Weise hergestellt werden, z. B., daß die gewünschte bzw. Ziel-DNA mit einem bestimmten Teil des Vektors kloniert wird und dann alkali-denaturiert wird, wie bekannt. Jeder Vektor hat eine Vielzahl von Klonierteilen. Jeder der Primer kann auf dem Weg erhalten werden, daß das Oligonucleotid mit 18 bis 20 Basen, welches zu einem Teil des Vektors komplementär ist, künstlich synthetisiert und fluoreszenzmarkiert wird. Da die erhaltenen Primer in ihrer Sequenzkonfiguration unterschiedlich voneinander sind, können sie nur mit einem besonderen der einzelnen Vektoren hybridisiert werden. Die Fluorophoren, die die Primer markieren, können FITC (Fluorescein-isothiocyanat) mit 515 nm maximaler Emissionswellenlänge, NBD-F (4-Fluor-7-nitrobenzofurazan) mit 540 nm maximaler Emissionswellenlänge, TRITC (Tetramethylrhodamin-isothiocyanat) mit 575 nm maximaler Emissionswellenlänge, Texas-Rot mit 605 nm maximaler Emissionswellenlänge usw. sein.

Das Verfahren zur Hybridisierung der Primer mit den Vektoren und die Bildung der DNA-Fragmente durch Synthese komplementärer Ketten kann mit üblichen Methoden durchgeführt werden.

Die Basensequenzen einer Vielzahl von Einzelstrang-DNA-Proben mit jeweils unterschiedlichen DNA-Basensequenzen können z. B. dadurch gleichzeitig bestimmt werden, daß die DNA-Fragmentgruppen, die gemäß der Sorte der Endgruppen klassifiziert sind, auf ihren jeweiligen Wanderungsbahnen wandern gelassen werden und, daß danach das Fluoreszenzlicht, das emittiert wird, durch das Anlegen eines Laserstrahls auf die Abschnitte mit einem bestimmten Abstand, zu denen die DNA-Fragmente wandern, durch bekannte Wellenlängentrennungsvorrichtungen, so wie Rotationsfilter oder ein Prisma aufgetrennt werden und jede der getrennten Wellenlängen einzeln mit einem zweidimensionalen Fluoreszenzlichtdetektor nachgewiesen wird, wodurch die Proben getrennt und nachgewiesen werden, und auf der anderen Seite die Sorte der Endgruppen jedes DNA-Fragments bekannt wird, weil bekannt ist, auf welcher Wanderungsbahn die Fluoreszenz emittiert wird.

Die Wanderungsbahnen können auf einem Polyacrylamidgel oder Agarosegel zwischen Gelträgerplatten, wie z. B. Quarz- oder Glasplatten, ausgebildet werden.

In Kürze kann das erfindungsgemäße Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung wie folgt zusammengefaßt werden. Unterschiedliche Primer werden mit Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen markiert. Zu Proben von unterschiedlichen DNA-Fragmenten, die mit den Primern hybridisiert sind, werden im gemischten Zustand für jede Endgruppe komplementäre Ketten synthetisiert. Die komplementär-ketten-synthetisierten Gemische werden auf unterschiedlichen Wanderungsbahnen entsprechend den jeweiligen Sorten der Endgruppen wandern gelassen. Fluoreszenzlicht, welches von Abschnitten emittiert wird, zu denen sie gewandert sind und auf die ein Laserstrahl angelegt ist, wird nachgewiesen und die vorbeiwandernden DNA-Fragmente werden nachgewiesen. Die Arten der Probe und der Endgruppen werden bestimmt durch die Emissionswellenlänge bzw. die Lage der Wanderungsbahnen, wodurch die DNA-Basense-

quenz jeder Probe bestimmt wird.

Weitere Vorteile, Merkmale und Anwendungsmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung in Verbindung mit der Zeichnung.

Fig. 1 ist ein Probenherstellungsschnittdiagramm einer erfindungsgemäßen Ausführungsform.

Fig. 2 ist eine Veranschaulichung und zeigt Gruppen der in den Schritten von Fig. 1 hergestellten Proben.

Fig. 3 ist eine schematische Ansicht, die eine Elektrophorese-Vorrichtung vom Mehrfarben-Fluoreszenz-Nachweistyp veranschaulicht, die in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet wird, und

Fig. 4 ist eine vergrößerte Ansicht von Linienabbildungen, die auf einem Bildschirm der Elektrophorese-Vorrichtung vom Mehrfarben-Fluoreszenz-Nachweistyp abgebildet werden, die in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet wird.

Bezugnehmend auf die Fig. 1 bis 4 wird unten eine erfindungsgemäße Ausführungsform beschrieben. Zuerst werden in der Ausführungsform zwei doppelsträngige DNAs (DNAa und DNAb) isoliert, deren Basensequenzen bestimmt werden sollen. In der vorliegenden Ausführungsform wird eine vordere und eine hintere Basensequenz der beiden doppelsträngigen DNAs in der rechten und umgekehrten Richtung bestimmt, d. h. insgesamt werden vier Basensequenzen bestimmt.

Zu diesem Zweck werden vier unterschiedliche Vektoren 1 bis 4 verwendet, um die jeweiligen DNA-Basensequenzen zu bestimmen. Insbesondere werden die vordere Einzelstrang-DNAa₁ und die hintere Einzelstrang-DNAa₂ der doppelsträngigen DNAa und die vordere Einzelstrang-DNAb₁ und die hintere Einzelstrang-DNAb₂ der doppelsträngigen DNAb in jeweils unterschiedliche Vektoren 1 bis 4 kombiniert, um neu angeordnete Vektoren zu bilden. Diese sind vier Einzelstrang-DNA-Proben 5 bis 8.

Andererseits werden die Primer 9 bis 12 hergestellt, die unterschiedliche DNA-Basensequenzen haben, wobei jeder nur mit einer Sorte der Vektoren 1 bis 4 hybridisieren kann. Die Primer sind jeweils mit Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen markiert, einschließlich eines Fluorescein-isothiocyanats mit 515 nm Emissionswellenlänge (FITC), 4-Fluor-7-nitrobenzofurazan mit 540 nm Emissionswellenlänge (NBD-F), Tetramethylrhodamin-isothiocyanat mit 573 nm Emissionswellenlänge (TRITC) und Texas-Rot mit 605 nm Emissionswellenlänge. Sodann wird jede der DNA-Proben 5 bis 8 mit den jeweiligen Primern 9 bis 12 zum Hybridisieren zusammengemischt. Jeder Primer 9 bis 12 kann nur mit einem entsprechenden der Vektoren 1 bis 4 hybridisiert werden. Die erhaltenen hybridisierten DNA-Proben, wie in Fig. 1 gezeigt, sind die DNA-Proben 5-9, 6-10, 7-11 und 8-12 als ein verarbeitetes Gemisch.

Dann wird das verarbeitete Gemisch in jeweils vier Teile geteilt. Jeder Teil wird einzeln mit Deoxynucleotid und Dideoxynucleotid zusammengesetzt, so daß die jeweilige Endgruppe der vier Teile Adenin, Cytosin, Guanin bzw. Thymin werden kann. Die Ergebnisse werden jeweiligen enzymatischen Umsetzungen unterworfen (in Fig. 1 gezeigt als A-, C-, G- bzw. T-Umsetzung) um die Komplementär-Ketten-Synthese zu vollziehen.

Die Komplementär-Ketten-Synthesen können individuelle DNA-Fragmentgruppen herstellen, deren Endgruppe des DNA-Fragments eine von den vier Sorten ist. Die DNA-Fragmentgruppen beinhalten die Gruppen A, C, G und T. Die Gruppe A (oder A-Familie) ist

die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Adenin ist. Insbesondere ist die DNA-Fragmentgruppe A eine Gruppe, in der die Endgruppen der DNA-Probe, die mit den Vektoren hybridisiert wurde, Adenin sind. Sie beinhaltet 5-9-A, 6-10-A, 7-11-A und 8-12-A, gezeigt in Fig. 1. Die Gruppe C (oder C-Familie) ist die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Cytosin ist. Insbesondere ist das DNA-Fragment der Gruppe C eine Gruppe, in der die Endgruppen der DNA-Proben, die mit den Vektoren hybridisiert sind, Cytosin sind. Sie beinhaltet 5-9-C, 6-10-C, 7-11-C und 8-12-C, gezeigt in Fig. 2. Die Gruppe G (oder G-Familie) ist die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Guanin ist. Insbesondere ist die DNA-Fragmentgruppe G eine Gruppe, in der die Endgruppen, der mit den Vektoren hybridisierten DNA-Proben, Guanin sind. Sie beinhaltet 5-9-G, 6-10-G, 7-11-G und 8-12-G, gezeigt in Fig. 2. Die Gruppe T (oder T-Familie) ist die, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Thymin ist. Insbesondere ist die DNA-Fragmentgruppe T eine Gruppe, in der die Endgruppen der mit den Vektoren hybridisierten DNA-Proben, Thymin ist. Sie beinhaltet 5-9-T, 6-10-T, 7-11-T und 8-12-T, gezeigt in Fig. 2.

In Fig. 3, in der die Elektrophoresevorrichtung vom Mehrfarben-Fluoreszenznachweistyp veranschaulicht ist, enthält eine Elektrophoretentrennplatte 110 Polyacrylamid einer Konzentration von 6%, gebildet in einem 0,3 mm Raum zwischen Quarzplatten von 200 mm x 300 mm (nicht gezeigt). Es sollte angemerkt werden, daß die Konzentration des Polyacrylamids hierin angezeigt wird als dessen totale Monomerkonzentration in %-Gewicht pro Volumen (g/ml). Die Elektrophoretentrennplatte 110 hat Probeninjektionstaschen 112, 113, 114 und 115. Die Probeninjektionstaschen tragen die DNA-Fragmentgruppen A, C, G und T jeweils dort hineingetropt durch eine Injektionsschablone bzw. Spritze, um diese wandern zu lassen. Die Elektrophoretentrennplatte 110 hat einen durch eine Seitenfläche derselben auf einen Abschnitt etwa 25 cm unterhalb des Bodens der Taschen gerichteten Laserstrahl 123, zu dem die DNA-Fragmentgruppen wandern, und zwar unter Verwendung einer Laserstrahlquelle 116. Dies bewirkt, daß die DNA-Fragmentgruppen Fluoreszenzlicht emittieren. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch ein Prisma (nicht gezeigt) geteilt und Spektren verschiedener Wellenlängen, die unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der Proben 5 bis 8 entsprechen, werden durch optische Bandpaßfilter erhalten. Diese Fluoreszenzspektren werden auf einen Fokussierungsteil eines zweidimensionalen Fluoreszenzlichtdetektors 117 fokussiert, um Fluoreszenzlichtabbildungen entsprechend den Proben 5 bis 8 zur Verfügung zu stellen.

Die Fluoreszenzlichtabbildungen, die auf den Fokussierungsteil des zweidimensionalen Fluoreszenzlichtdetektors 117 fokussiert sind, können durch einen Bildschirm 121 als vier Linienbilder 122 entsprechend den jeweiligen Proben 5 bis 8 wiedergegeben werden. Zur gleichen Zeit können die Fluoreszenzlichtbilder durch eine Anzeige 120, durch eine Steuerung 118 und eine Datenverarbeitungseinheit 119 wiedergegeben werden.

Fig. 4 zeigt eine vergrößerte Abbildung der Linienbilder 122, die auf dem Bildschirm 121 abgebildet werden. Die vier Linienbilder entsprechen den jeweiligen Proben 5 bis 8 abwärts. Die Flächen A, C, G und T, angezeigt durch Punktlinien sind Flächen, die den jeweiligen DNA-Fragmentgruppen A, C, G und T jeder der Probe entsprechen. Die auf diese Weise erhaltenen Daten können arithmetisch verarbeitet werden, um die DNA-Ba-

sensequenzen simultan zu bestimmen.

In dieser Ausbildungsform werden als Laserstrahlquellen ein Argonlaser mit 488 nm Wellenlänge und ein He-Ne-Laser mit 543 nm Wellenlänge verwendet. Der Argonlaser und der He-Ne-Laser können in einer Einheit integriert werden, um den gleichen Abschnitt oder unterschiedliche Abschnitte zu bestrahlen, die 2 mm oder mehr beabstandet sind. Für die Anregung von FITC und NBD-F der markierenden Fluorophore wird der Argonlaser verwendet; für die Anregung von TRITC und Texas-Rot wird der He-Ne-Laser verwendet. Für große Probenanzahlen können zusätzliche Fluorophore mit längeren Wellenlängen verwendet werden. Für die zusätzlichen Fluorophore kann ein weiterer He-Ne-Laser mit 633 nm Wellenlänge oder ein Halbleiterlaser verwendet werden.

Die oben beschriebene Ausführungsform läßt deutlich erkennen, daß das erfindungsgemäße Verfahren insofern vorteilhaft ist, daß so viele Proben bearbeitet werden können, wie Mischungsformen selbst, wobei gleichzeitig der betriebsmäßige Aufwand reduziert werden kann. In dem Verfahren, in dem die DNA-Fragmentgruppen A, C, G und T mit verschiedenen Farben markiert sind und auf der gleichen Bahn wandern, müssen die Wanderungszeitdifferenzen, bedingt durch die Farbdifferenzen korrigiert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch in dieser Hinsicht vorteilhaft, weil es keine Korrektur der Wanderungsgeschwindigkeitsdifferenzen benötigt, die durch den Unterschied der Markierungsfarbstoffe bedingt sind, da die gleiche Probe mit der gleichen Farbe markiert werden kann.

Patentansprüche

1. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung, umfassend die Schritte:

- i) Klonieren einer Vielzahl von DNA-Proben mit jeweils unterschiedlichen Vektoren (1, 2, 3, 4);
- ii) Komplementär-Ketten-Synthetisieren der Proben (5, 6, 7, 8) erhalten in Schritt i) im Gemisch mit Primern (9, 10, 11, 12), entsprechend den jeweiligen Vektoren (1, 2, 3, 4), wobei die Anzahl der Primer (9, 10, 11, 12) der Anzahl der Sorten von Vektoren (1, 2, 3, 4) entspricht, jeder dieser Primer (9, 10, 11, 12) in der Lage ist, ausschließlich mit einem spezifischen dieser Vektoren (1, 2, 3, 4) zu hybridisieren, und die Primer (9, 10, 11, 12) mit Fluorophoren markiert sind, die jeweils unterschiedliche Wellenlängen haben;
- iii) Herstellen von vier DNA-Fragmentgruppen mit jeweils vier unterschiedlichen Endgruppen aus dem behandelten Gemisch (5-9, 6-10, 7-11, 8-12) erhalten in Schritt ii); und
- iv) elektrophoretisches Wandernlassen der vier DNA-Fragmentgruppen und Nachweis des Fluoreszenzlichts, emittiert von den jeweiligen DNA-Fragmenten in jeder DNA-Fragmentgruppe.

2. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung, umfassend die Schritte:

- i) Klonieren einer Vielzahl von unterschiedlichen Einzelstrang-DNA-Proben, deren Basensequenz bestimmt werden soll, mit jeweiligen Vektoren (1, 2, 3, 4), unterschiedlich für jede Probe;
- ii) Markieren der Primer, deren Anzahl der

Anzahl der Sorten von Vektoren (1, 2, 3, 4) entspricht, deren Basensequenzen unterschiedlich voneinander sind und die nur mit einem spezifischen Vektor hybridisiert werden können, und zwar mit jeweiligen Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen;

iii) Hybridisieren der Primer (9, 10, 11, 12), markiert mit den jeweiligen Fluorophoren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen, mit einer Vielzahl von entsprechenden Vektoren (1, 2, 3, 4) für die jeweiligen Einzelstrang-DNA-Proben (5, 6, 7, 8), kloniert mit den Vektoren (1, 2, 3, 4) derart, daß all die DNA-Proben (5, 6, 7, 8), kloniert mit den Vektoren (1, 2, 3, 4), gemischt und verarbeitet werden mit all den Primern (9, 10, 11, 12);

iv) Teilen jeder der Mischungen (5-9, 6-10, 7-11, 8-12) der Proben, verarbeitet in Schritt 3, in vier Teile;

v) Komplementär-Ketten-Synthetisieren der viergeteilten Gemische (5-9, 6-10, 7-11, 8-12) der Proben individuell, so daß Endgruppen davon Adenin, Cytosin, Guanin bzw. Thymin werden können, wobei individuell eine DNA-Fragmentgruppe hergestellt wird, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Adenin ist, eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Cytosin ist, eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Guanin ist, und eine DNA-Fragmentgruppe, in der die Endgruppe des DNA-Fragments Thymin ist; und

vi) elektrophoretisches Wandernlassen der DNA-Fragmentgruppen, Nachweisen des individuellen Fluoreszenzlichts, emittiert von den DNA-Fragmentgruppen, und Trennen und Nachweisen der Proben nach ihren unterschiedlichen Emissionswellenlängen, und zwar von einer Vielzahl von DNA-Proben.

3. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 2, in dem die Trennung und der Nachweise der DNA-Fragmentgruppen derart durchgeführt wird, daß die Proben getrennt und nachgewiesen werden unter Verwendung der emittierten Wellenlängenunterschiede in jeder DNA-Fragmentgruppe, die elektrophoretisch auf den entsprechenden Wanderungsbahnen bewegt wird und zur gleichen Zeit wird die Sorte der Endgruppen spezifiziert durch die Lage der Wanderungsbahnen, an der das Fluoreszenzlicht emittiert wird, so daß eine Vielzahl von unterschiedlichen Basensequenzen einer Einzelstrang-DNA-Probe simultan bestimmt wird.

4. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 3, in dem die Proben separiert und nachgewiesen werden durch Verwendung von Fluoreszenzlichtwellenlängenunterschieden der jeweiligen DNA-Fragmentgruppen, daß emittiert wird durch das Anlegen eines Laserstrahls (123) auf Abschnitte mit bestimmten Abständen, zu denen die DNA-Fragmentgruppen auf den Wanderungsbahnen wandern.

5. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 4, in dem die Trennung und der Nachweis der Proben unter Verwendung der Fluoreszenzlichtemissionswellenlängenunterschiede der DNA-Fragmentgruppen in der Art durchge-

führt wird, daß das Fluoreszenzlicht der DNA-Fragmentgruppen mit einer Wellenlängentrennvorrichtung aufgetrennt wird und jede der getrennten Wellenlängen individuell durch einen Detektor (117) nachgewiesen wird.

6. Verfahren zur DNA-Basensequenzbestimmung nach Anspruch 5, in dem der Detektor (117) ein zweidimensionaler Fluoreszenzlichtdetektor ist.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

– Leerseite –

FIG. 1

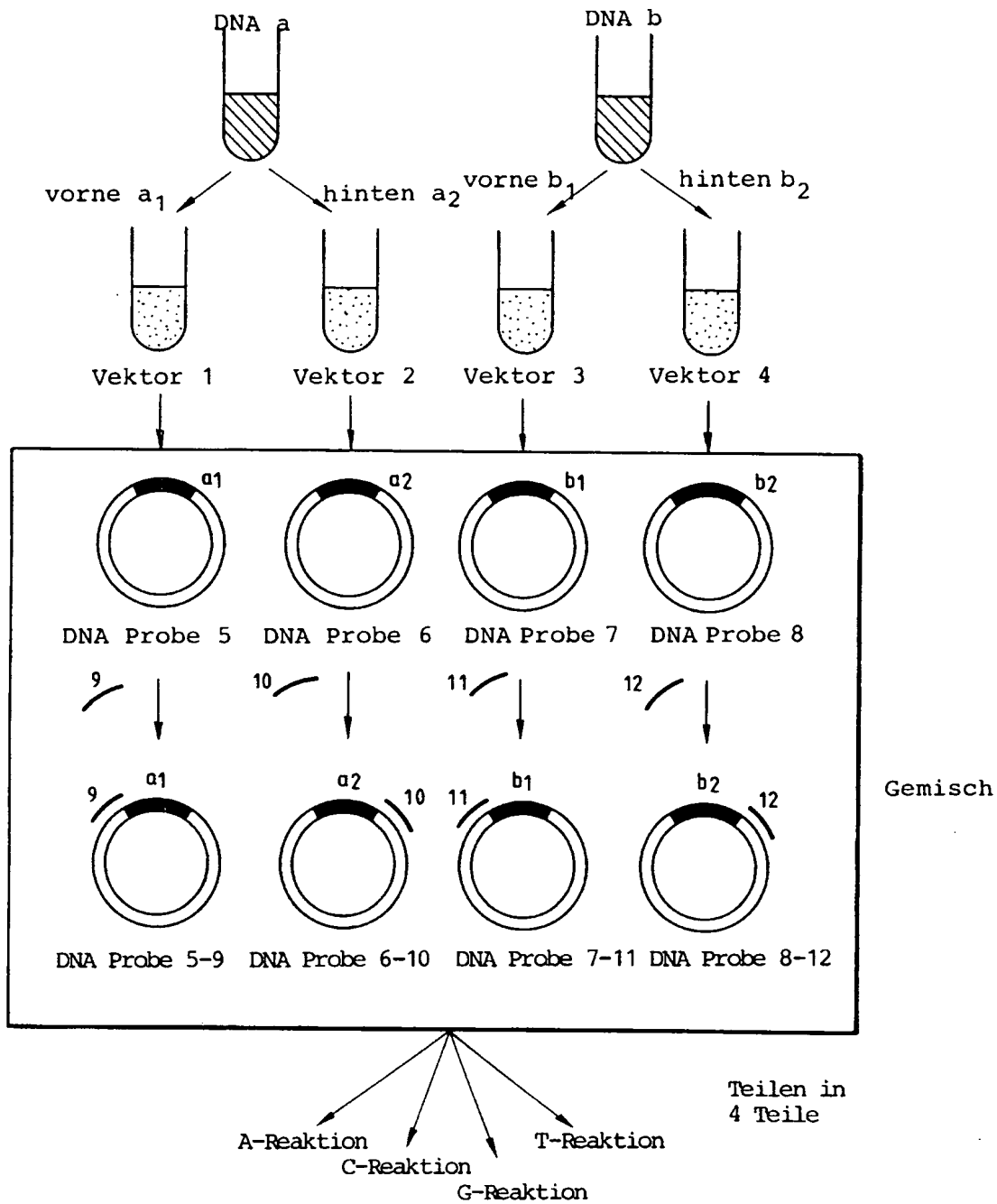


FIG. 2

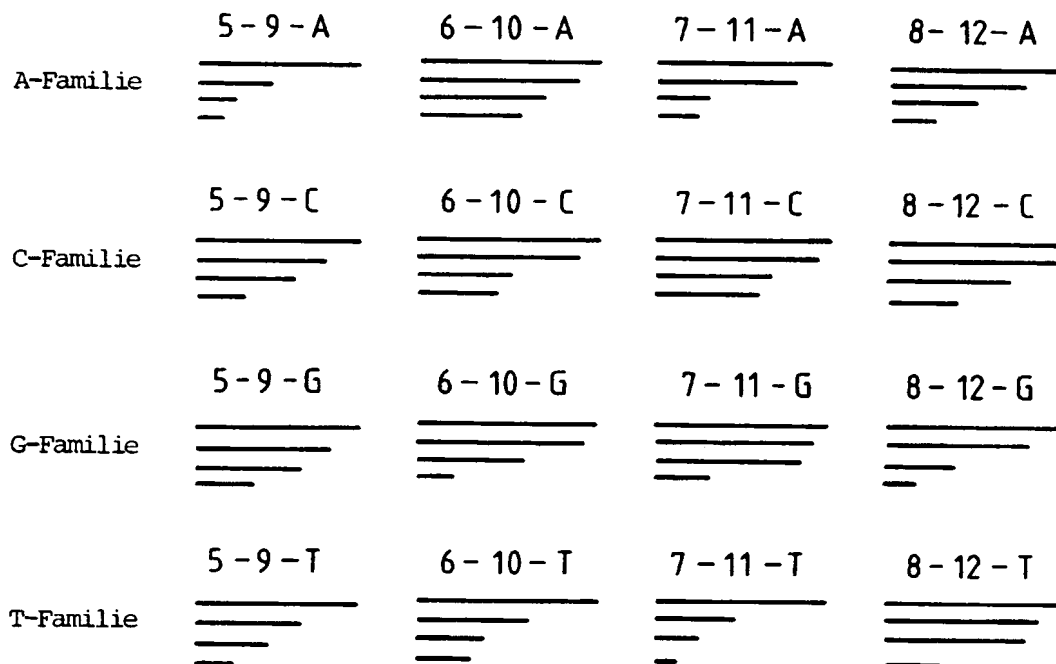


FIG. 3

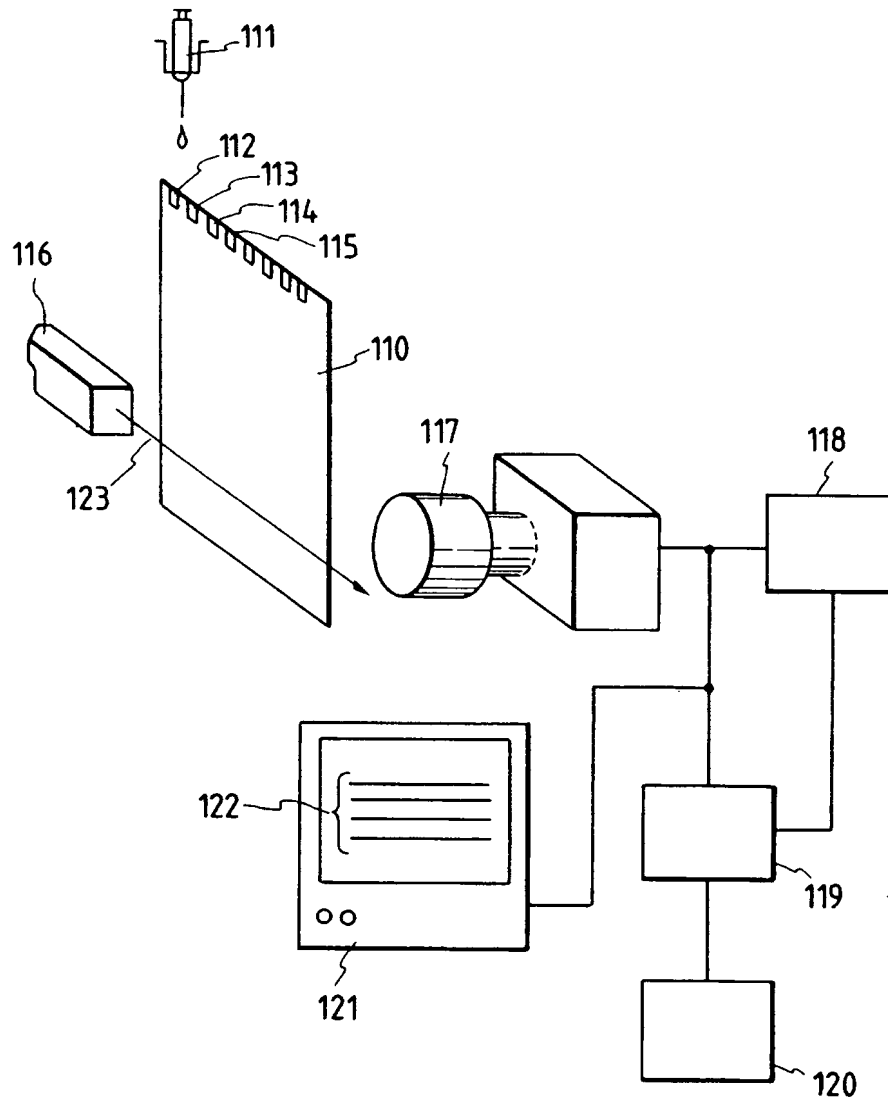


FIG. 4

	A Region	C Region	G Region	T Region
Probe 5-9				
Probe 6-10				
Probe 7-11				
Probe 8-12				